

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *IN VITRO* DE *DIOCLEA VIRGATA*.

Danilo Ferreira Pinto¹; Clayton Queiroz Alves²; Carol Anne Pereira Silva³

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Licenciatura em Química, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: daniw.f@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cleiroz@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carolanneps@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Fitoquímica; Avaliação Citotóxica; *Dioclea virgata*.

INTRODUÇÃO

A família Leguminosae (Fabaceae) compreende cerca de 650 gêneros e 18000 espécies espalhadas em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Nesta família se inclui o gênero *Dioclea* que possui cerca de 50 espécies das quais, diversas são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças dos rins e da próstata. Muitas espécies deste gênero foram estudadas através da análise de proteínas, de onde foram isoladas lectinas das sementes destas espécies com atividade anticancerígena. Entretanto, até o presente momento poucas espécies deste gênero foram estudadas do ponto de vista Fitoquímico (ALVES, 2012).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a citotoxicidade de extratos vegetais é o teste de letalidade frente à *Artemia salina* desenvolvido por Meyer (1982) e adaptado por Serrano (1996). Apesar de ser relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade. Esta metodologia vem sendo empregada além da linha de pesquisa em produtos naturais, sendo observada sua aplicabilidade em áreas como síntese de medicamentos, farmacologia, neurologia, química, meio ambiente, ecologia, screening biológico e outros (HIROTA et al., 2012).

O presente trabalho buscou contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação de possíveis efeitos farmacológicos da espécie *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff., na perspectiva de ampliar os conhecimentos científicos sobre as espécies da família Leguminosae (Fabaceae).

METODOLOGIA

Um espécime de *Dioclea* foi coletada no campus da UFBA-Ondina em Salvador e sua exsiccata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS. O material vegetal foi seco em estufa a 40°C com ventilação sendo triturado em moinho de facas e posteriormente macerado em metanol para extração dos seus constituintes químicos;

O filtrado obtido foi concentrado em rotaevaporador a 45°C sob pressão reduzida para fornecer o extrato bruto, que foi posteriormente particionado com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O extrato acetato de etila e suas frações foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica frente ao micro crustáceo *Artemia salina* pelo método desenvolvido por Meyer (1982) e

adaptado por Serrano (1996). As frações que apresentarem maior letalidade foram fracionados por cromatografia em coluna (CC), sendo o monitoramento das frações e substâncias isoladas realizado através de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As substâncias isoladas foram submetidas a análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais), para identificação estrutural.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

O extrato bruto dos caules de *D. virgata* também foi preparado no Laboratório de Extração de Produtos Naturais do Horto Florestal da UEFS. Os caules coletados foram secos em estufa com ar circulante a uma temperatura média de 50°C por um período de 5 dias, em seguida, estes foram reduzidos em tamanhos menores para posterior trituração em liquidificador industrial.

A partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto do caule de *D. virgata* usando solventes orgânicos de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio e acetato de etila, resultaram na fração hexânica, fração clorofórmica e fração acetato de etila.

Avaliação da Atividade Citotóxica Utilizando *Artemia salina*: Para realização da avaliação de citotoxicidade, inicialmente pesou-se 19 g de sal marinho e adicionou-se em 5 litros de água mineral (água sem cloro) e agitou-se até total dissolução a fim de adquirir uma solução de água do mar artificial. Em seguida esta solução foi ao aquário e uma bomba foi utilizada para oxigenação da água. O aquário foi previamente dividido em dois ambientes: claro e escuro, sendo que do lado de fora uma lâmpada incandescente de 60 w iluminava o compartimento claro.

A letalidade frente à *Artemia salina* foi mensurada analisando a porcentagem de mortos em 4 concentrações específicas das amostras. Para avaliação do extrato bruto e frações semipurificadas dos caules foi realizada utilizando as concentrações de 400, 250, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ das amostras.

O extrato acetado de etila do caule (2,076g) foi submetido à Cromatografia em Coluna (CC) empregando-se como fase estacionária gel de sílica 60, e como fase móvel uma mistura de Clorofórmio-Metanol em grau crescente de polaridade. Desta coluna principal foram recolhidas 21 frações de 100 mL cada, que foram reunidas posteriormente em 8 subfrações após análise em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e reveladas em UV e Iodo. A fração ACDV 1-A foi selecionada para uma nova CC usando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel uma solução de metanol e diclorometano na proporção 1:1. Foram recolhidas 27 frações de 5mL cada que foram agrupadas em 10 frações (tabela 1) após análise em CCD reveladas em câmara de UV e Iodo.

Tabela 1: Frações Sephadex agrupadas

Código	Frações reunidas	Massa (g)
ACDV 1A-1	1-2	0,0018
ACDV 1A-2	3	0,0285
ACDV 1A-3	4-7	0,0270

ACDV 1A-4	8	0,0313
ACDV 1A-5	9-11	0,0032
ACDV 1A-6	12-16	0,0036
ACDV 1A-7	17	0,0032
ACDV 1A-8	18-22	0,0041
ACDV 1A-9	23-24	0,0019
ACDV 1A-10	25-27	0,0015

FONTE: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015-2016

A fração ACDV 1A-4 foi selecionada para uma nova CC usando Sephadex com fase móvel uma solução de metanol e diclorometano na proporção 1:1. Desta coluna foram recolhidas 50 frações de 5 mL cada que foram agrupadas posteriormente em 4 subfrações. A fração ACDV 1A4-D foi selecionada para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foram utilizados como padrões os ácidos 2-hidroxibenzóico (Ácido Salicílico), 4-hidroxibenzóico, 3,4-dihidroxibenzóico e 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (Ácido vanílico), tendo com parâmetro de identificação o tempo de retenção e o padrão de bandas no Ultravioleta. Foram observados três picos majoritários (Figura 1) que, quando comparados aos dos padrões utilizados, permitiram a identificação das substâncias ácido vanílico e do ácido 4-hidroxibenzóico nos tempos de retenção 11 minutos e 20 minutos, respectivamente. A Leitura foi feita em 280nm e uma varredura entre 200 e 400nm usando o método mostrado na tabela 3.

Tabela 3: Método analítico utilizado para análise por CLAE

Tempo	Água	Metanol	Fluxo
0	65%	35%	0,5mL/min
20	25%	75%	-
735	25%	75%	-

FONTE: PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015-2016

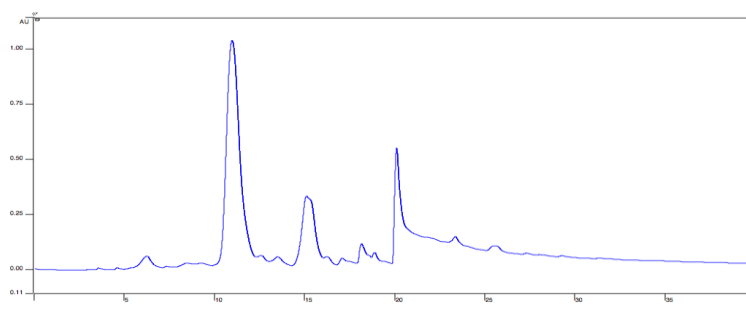


Figura 1: Cromatograma da fração ACDV 1A4-D. **FONTE:** PESQUISA EXPERIMENTAL, 2015-2016

Fracionamento de ACDV 1-B: A fração ACDV 1-B (0,086g) foi selecionada para uma nova CC usando Sephadex como fase estacionária e como fase móvel uma solução de metanol e diclorometano na proporção 1:1. Foram recolhidas 18 subfrações de 2mL cada e agrupadas em 6 frações após avaliação do perfil químico em CCD reveladas em câmara de UV e Iodo. As frações ACDV 1B-1, 1B-5 e 1B-6 foram enviadas para aquisição dos espectros de RMN de ¹H no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UFG, e tiveram suas estruturas identificadas pelo Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves através da análise de seus deslocamentos químicos e comparação com dados da literatura. Assim, a fração ACDV 1B-1 foi identificada como sendo o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (Masuoka et al., 2007), e as frações ACDV 1B-6 como sendo os flavonoide 7,2',3'-trihidroxiflavona (V. Junior et al, 2008). Os espectros da fração ACDV 1B-5 encontram-se em análise.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo realizado foi possível comprovar a alta capacidade letal apresentada pelo extrato acetato de etila dos caules de *D. virgata* frente ao microcrustaceo *Artemia salina*. Neste trabalho foi possível ainda identificar a presença dos ácidos 4-hidroxibenzóico e 3,4-dihidroxibenzóico através da análise por CLAE-DAD. Foi ainda isolado o flavonoide 7,2',3'-trihidroxiflavona através de técnicas cromatográficas e identificado através de análise dos dados espectrométricos de RMN de ¹H e de ¹³C. Assim, o presente trabalho contribuiu para a pesquisa científica no que se refere à investigação de possíveis efeitos farmacológicos da espécie *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff, na perspectiva de ampliar os conhecimentos científicos sobre as espécies que medram o semi-árido nordestino. Porém ainda faz-se importante a continuação do estudo fitoquímico visando identificação e isolamento de mais substâncias com potenciais bioativo, bem como testes de atividade biológica com as substâncias isoladas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q., Estudo Químico e Avaliação Biológica de Duas Espécies de Leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum*, Tese de Doutorado - UFBA, 2012.
- HIROTA, B. C. K.; PAULA, C. S.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE *IN VITRO*: APLICABILIDADE DO ENSAIO DE LETALIDADE FRENTE À *Artemia salina*. Visão Acadêmica, Curitiba, v.13, n.2, 2012
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J.L. *Planta Medica* 45, 31-34, 1982.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: A revision. *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 118 – 120. 1996.
- SILVA, M. F. da, Nomes populares das Leguminosas do Brasil; Manaus: EDUA/IMPA/FAPEAM, 2004.